

## **ISOLASI BROMELIN DARI BUAH NANAS (*Ananas comosus L. Merr*) DENGAN GARAM DAPUR**

*Isolation of Bromeline from Pineapple Fruit (*Ananas Comosus L. Merr*)  
with Kitchen Salt*

**Nurhayati Dewi, Mulia Yuliansyah Sundara, Merdekawati Fusvita**

Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung,  
dewinurhayati66.dn@gmail.com

### **ABSTRAK**

Buah nanas mengandung senyawa bromelin yang merupakan protease sulfhidril (-SH) yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada molekul protein yang akan menghasilkan asam amino. Proses yang dilakukan untuk mendapatkan bromelin dari buah nanas dengan cara isolasi oleh garam anorganik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pH optimal dalam mengisolasi bromelin, menentukan prosentase rendemen bromelin, dan menentukan nilai aktivitas spesifik bromelin. Rancangan penelitian secara eksperimen dengan 4 perlakuan pada variasi pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9 dengan pengulangan 3 kali. Dianalisis dengan uji Anova. Dari hasil penelitian diperoleh hasil rata-rata rendemen pada pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9 adalah 3,9080%, 4,1758%, 5,8144%, dan 7,7768%. Nilai rata-rata aktivitas enzim spesifik pada pH 6, pH 7, pH 8, dan pH 9 adalah 2,43 U/mg, 2,69 U/mg, 2,29 U/mg, dan 2,13 U/mg. Simpulan dari hasil penelitian di dapat pH optimal untuk isolasi bromelin pada pH 9 dengan hasil rendemen 7,7768%, dan aktivitas enzim spesifik optimal pada pH 7 dengan nilai 2,69 U/mg.

**Kata kunci** : Buah nanas (*Ananas comosus L. Merr*), Bromelin, Aktivitas enzim

### **ABSTRACT**

*Pineapple contains a bromelain compound which is a sulfhydryl protease (-SH) which can hydrolyze the peptide bonds in protein molecules which will produce amino acids. The process carried out to obtain bromelain from pineapple is isolated by inorganic salts. This study aims to determine the optimal pH in isolating bromelain, determine the percentage yield of bromelain, and determine the specific activity value of bromelain. The research design was experimental with 4 treatments at various pH 6, pH 7, pH 8 and pH 9 with 3 repetitions. Analyzed by Anova test. The results showed that the average yields at pH 6, pH 7, pH 8 and pH 9 were 3.9080%, 4.1758%, 5.8144%, and 7.7768%. The average values of specific enzyme activity at pH 6, pH 7, pH 8, and pH 9 were 2.43 U / mg, 2.69 U / mg, 2.29 U / mg, and 2.13 U / mg. The conclusion from the research results is that the optimal pH for bromelain isolation is at pH 9 with a yield of 7.7768%, and optimal specific enzyme activity at pH 7 with a value of 2.69 U / mg.*

*Key words: Pineapple (*Ananas comosus L. Merr*), Bromelin, Enzyme activity*

### **PENDAHULUAN**

Enzim adalah biokatalisator yang merupakan pusat dari setiap proses biokimia. Enzim bertindak dalam urutan

terorganisir, dan berperan dalam proses katalisasi ratusan reaksi bertahap untuk mendegradasi molekul nutrisi, melestarikan dan mengubah energi

kimia, dan membuat makromolekul biologis dari prekursor sederhana<sup>1,2</sup>.

Buah nanas dikenal secara luas oleh masyarakat Indonesia karena tanamannya banyak tumbuh di Indonesia yang beriklim tropis. Tanaman ini banyak dibudidayakan di daerah tropis dan sub tropis, dimana aslinya berasal dari Brasil (Amerika Selatan). Buah nanas sering dimanfaatkan sebagai pengempuk daging karena mengandung komponen bromelin yang merupakan enzim *protease sulfhidril* (-SH) yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi ikatan senyawa asam amino yang lebih sederhana, sehingga dapat mengempukan daging. Bromelin juga dapat dimanfaatkan sebagai obat gangguan pencernaan, peluruh sel-sel mati dan anti inflamasi. Enzim ini juga digunakan untuk aplikasi industri pada pelarutan protein gandum, penstabilan bir, produksi hidrolisat protein, dan penyamakan kulit<sup>3,4,5</sup>.

Proses yang dilakukan untuk mendapatkan ekstrak kasar bromelin dari buah nanas dengan isolasi enzim berdasarkan kelarutan seperti pengendapan dengan pelarut organik dan pengendapan dengan garam. Penambahan pelarut organik atau garam ke dalam larutan berisi enzim menyebabkan kelarutan enzim di dalam larutan akan turun, dan enzim akan mengendap.

Garam-garam netral yang ditambahkan dengan konsentrasi tinggi akan mampu mengendapkan protein. Pengendapan terus terjadi karena kemampuan ion garam untuk menghidrasi, sehingga terjadi kompetisi antara garam anorganik dengan molekul protein untuk mengikat air. Garam anorganik lebih kuat menarik air dibandingkan garam organik, maka jumlah air yang tersedia untuk molekul protein akan berkurang sehingga akan terjadi pengendapan protein, dan bromelin yang merupakan senyawa protein akan mudah diisolasi dengan

penambahan garam-garam anorganik tersebut<sup>6</sup>.

Garam dapur merupakan salah satu jenis garam anorganik yang merupakan kumpulan senyawa dengan sebagian besar terdiri dari Natrium Klorida (NaCl) (>80%), serta senyawa-senyawa lain seperti Magnesium Klorida, Magnesium Sulfat, kalsium Klorida. Garam mempunyai sifat karakteristik higroskopis yang berarti mudah menyerap air, tingkat kepadatan sebesar 0,8 – 0,9 dan titik lebur pada tingkat suhu 801° C<sup>6</sup>.

Sebagian besar waktu yang dibutuhkan dalam isolasi enzim yaitu digunakan untuk uji aktivitas dengan ukuran yang berbeda-beda. Aktivitas enzim tergantung pada kondisi seperti suhu, pH dan konsentrasi. Oleh karena itu, untuk membandingkan aktifitas enzim, diperlukan suatu cara khusus dan selalu menggunakan kondisi yang sama<sup>6</sup>. Aktivitas enzim sering digunakan dalam satuan unit (U) yaitu jumlah enzim yang mengkatalisis 1 mikro-mol substrat per menit pada kondisi tertentu, sedangkan kemurnian enzim dinyatakan dalam aktivitas spesifik yaitu jumlah unit aktivitas per miligram protein<sup>7</sup>.

Hasil penelitian Kumaunang dan Kamu (2011) pada penelitian "Aktivitas Bromelin dari Ekstrak Kulit Nenas" dengan menggunakan garam ammonium sulfat 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, dan 60% sebagai pengeksktr bromelindan didapatkan hasil yaitu temperatur dan pH optimal dari bromelin adalah 65°C dan pH 5,0 – 6,5, sedangkan konsentrasi protein yang tertinggi pada ekstrak garam ammonium sulfat 60%<sup>8</sup>.

Pada penelitian yang menggunakan bonggol nanas sebagai sampelnya didapatkan semakin tinggi konsentrasi amonium sulfat maka semakin banyak kadar protein bromelin dan dari hasil penelitian ini konsentrasi 60% menghasilkan kadar protein yang tertinggi<sup>9</sup>.

Penelitian yang menggunakan garam amonium sulfat dengan

konsentrasi 40%, 60%, 80%, dan 100% sebagai pengekstrak bromelin, di dapatkan konsentrasi amonium sulfat yang paling optimal untuk mengisolasi bromelin adalah pada konsentrasi 60%, nilai rendemennya 1,07%, dan Aktivitasnya adalah 3,33 U/mL<sup>10</sup>.

Berdasarkan latar belakang di atas peneliti bermaksud untuk mengadakan penelitian isolasi bromelin dari buah nanas dengan garam dapur pada konsentrasi garam 40% dengan variasi pH 6, 7, 8 dan 9.

## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang bertujuan mengisolasi bromelin dari buah nanas (*Ananas comosus*) dengan garam dapur 40% dengan variasi pH yaitu 6, 7, 8, dan 9, kemudian dihitung rendemen, dan nilai aktivitas spesifik. Buah nanas yang digunakan adalah nanas varietas Subang (*Ananas comosus L. Merr.*). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Bandung dan Laboratorium Analisis Kesehatan Bandung.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau, baskom, saringan, corong, tabung reaksi, rak tabung, gelas kimia, blender, kertas saring, kertas lakmus, mikro pipet, tip, neraca analitik, timbangan teknis, sentrifugasi, kulkas, hot plate, spektrofotometer.

Bahan yang digunakan adalah buah nanas, garam dapur, buffer fosfat, reagent Bradford, kasein, TCA, NaOH, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, HCl, Tirosin.

### Pembuatan Ekstrak Kasar Buah Nanas.

Buah nanas dipotong kecil-kecil dan ditimbang sebanyak 1.500 g, selanjutnya diblender, diperas, dan disaring sehingga diperoleh cairan jernih (ekstrak kasar bromelin). Ekstrak kasar disaring, kemudian diambil filtratnya yang jernih dan disimpan pada suhu 4°C<sup>8</sup>. Selanjutnya dipisahkan cairan jernih nanas ke dalam 4 buah gelas kimia 100

mL sebanyak masing-masing 50 mL, kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing sampel 50 mL buffer pH 6, 7, 8 dan 9, dan disimpan pada suhu 4°C selama 3 jam.

### Isolasi ekstrak kasar Bromelin

Ke dalam filtrat ekstrak kasar bromelin ditambahkan garam dapur 40% sambil diaduk menggunakan pengaduk magnet selama 45 menit, dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C<sup>11</sup>. Kemudian, disaring dengan kertas saring Whatman. Endapan yang diperoleh dikeringkan pada freezer dryer

### Rendemen Ekstrak Kasar Bromelin

Rendemen bromelin diperoleh dari berat enzim yang dihasilkan dibagi berat buah nanas yang digunakan.

$$\text{Rendemen Enzim (\%)} \\ = \frac{\text{Berat enzim bromelin}}{\text{Berat buah nanas}} \times 100\%$$

### Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Bromelin

Aktivitas bromelin ditentukan berdasarkan metode Murachi dengan menggunakan substrat kasein. Sebanyak 40 mg/mL substrat kasein direaksikan dengan 0,4 mg/mL enzim dalam larutan buffer fosfat pH 7. Perbandingan substrat dan enzim (100:1). Kemudian, di inkubasi pada suhu 55°C selama 15 menit. Setelah diinkubasi, ke dalam campuran reaksi ditambahkan 1 mL larutan asam trikloroasetat 30%. Protein yang terkoagulasi dipisahkan dengan sentrifugasi. Filtrat yang diperoleh diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm. Sebagai kontrol digunakan enzim yang telah dimatikan aktivitasnya melalui pemanasan<sup>12</sup>.

### Pembuatan Larutan Substrat Kasein

Sebanyak 2 g kasein ditimbang dalam labu ukur dan ditambahkan 5 ml NaOH 0,1N serta pelarut buffer fosfat pH

7 sampai batas 100 ml. Larutan disimpan dalam refrigerator selama 1 hari<sup>12</sup>.

### Pembuatan Larutan Standar Tirosin

Sebanyak 0,1 g tirosin ditimbang dan dilarutkan dengan 7 mL HCl 0,1N dalam labu ukur kemudian ditambahkan aquadest sampai tanda batas 100 mL. Disiapkan 5 buah tabung reaksi kemudian dibuat larutan working standar 1–5. Tabung 1 ( 1 mL tirosin + 9 mL aquadest ), tabung 2 ( 2 mL tirosin + 8 mL aquadest ), tabung 3 ( 3 mL tirosin + 337 mL aquadest ), tabung 4 ( 4 mL tirosin + 6 mL aquadest ), dan tabung 5 ( 5 mL tirosin + 5 mL aquadest ). Setiap konsentrasi tirosin diukur absorbansinya pada spektrofotometer  $\lambda$  280 nm<sup>15</sup>.

### Pembuatan Garam Dapur 40%

Sebanyak 40,0 g garam dapur ditimbang dan dilarutkan dengan 100,0 mL aquadest.

### Uji Kadar Protein Bromelin metode Bradford

*Reagens Bradford :*

Sebanyak 10,0 mg *comasie brilliant blue G-250* dilarutkan dalam 5 mL ethanol 95%, kemudian ditambahkan 10 mL asam fosfat 85% dan terakhir diencerkan dengan aquadest sampai 100 mL<sup>16</sup>.

### Prosedur Uji Protein

Masukkan 50  $\mu$ l larutan sampel ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2,5 mL reagens Bradford. Kocok hingga homogen dan diamkan hingga 10 menit, selanjutnya diukur absorbansinya pada  $\lambda$  595 nm<sup>16</sup>.

### Uji Aktivitas Spesifik Bromelin

Aktivitas Spesifik Enzim yaitu jumlah unit aktivitas Enzim per miligram Protein

### Pengumpulan dan Analisis Data :

Data diperoleh dari hasil isolasi dengan menggunakan garam dapur 40% pada variasi pH 6; 7; 8; dan 9. Dihitung rendemen bromelin, uji aktivitas, uji kadar protein, dan aktivitas spesifiknya.

Data hasil penelitian dihitung dengan menggunakan uji statistik *one-way Anova*.

### HASIL Rendemen

Berat bromelin yang merupakan hasil isolasi garam dapur kemudian dibagi berat sampel nanas akan di dapatkan nilai rendemen bromelin.

Rendemen bromelin hasil isolasi garam dapur pada konsentrasi 40% pada pH 6, pH 7, pH 8, dan pH 9 di dapatkan hasil seperti terlihat pada tabel 1 dan hasil uji Duncan terlihat pada table 2.

**Tabel 1. Rendemen Bromelin Hasil isolasi Garam Dapur 40% Pada pH 6, pH 7, pH 8, pH 9**

No	pH	Pengulangan (%)			Rata-rata
		I	II	III	
1	6	3,7992	4,0040	3,9209	3,9080
2	7	4,1311	3,8176	4,5786	4,1758
3	8	4,5802	5,2711	7,5918	5,8144
4	9	5,6080	7,9578	9,7647	7,7768

**Tabel 2. Uji Duncan Rendemen Bromelin Hasil isolasi Garam Dapur 40% Pada pH 6, pH 7, pH 8, pH 9**

pH	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan <sup>a</sup> pH 9 GD	3	3.908033	
pH 8 GD	3	4.175767	
pH 7 GD	3	5.814367	5.814367
pH 6 GD	3		7.776833
Sig.		.129	.107

### Aktivitas Spesifik Enzim

Penilaian aktivitas spesifik merupakan salah satu cara untuk menentukan spesifiknya kandungan enzim yang terkandung dari hasil rendemen, dengan melihat berapa nilai aktivitas bromelin yang dibanding dengan kandungan proteinnya. Nilai Aktivitas bromelin dapat dilihat pada tabel. 3, Kadar Protein pada tabel 4, dan aktivitas spesifik bromelin pada tabel 5.

**Tabel 3. Nilai Aktivitas Bromelin Hasil isolasi Garam Dapur 40% Pada pH 6, pH 7, pH 8, pH 9**

No	pH	Aktivitas Bromelin (U/mL)
1	6	5,67
2	7	7,67
3	8	7,67
4	9	6,67

**Tabel 4. Kadar Protein Bromelin Hasil isolasi Garam Dapur 40% Pada pH 6, pH 7, pH 8, pH 9**

No	pH	Pengulangan (mg/mL)			Rata-rata
		I	II	III	
1	6	2,3320	2,3320	2,3320	2,3320
2	7	2,6697	2,9634	2,9424	2,8585
3	8	3,3870	3,2809	3,3870	3,3516
4	9	3,1162	3,2516	3,0366	3,1348

**Tabel 5. Aktivitas Spesifik Bromelin Hasil Isolasi Garam Dapur 40% pada pH 6, pH 7, pH 8, pH 9**

No	pH	Pengulangan (U/mg)			Rata
		I	II	III	
1	6	2,43	2,43	2,43	2,43
2	7	2,87	2,59	2,61	2,69
3	8	2,26	2,34	2,26	2,29
4	9	2,14	2,05	2,20	2,13

**Tabel 6. Uji Duncan Aktivitas Spesifik Bromelin Hasil Isolasi Garam Dapur 40% pada pH 6, pH 7, pH 8, pH 9**

pH	N	Subset for alpha = 0.05
----	---	-------------------------

	1	2	3
Duncan <sup>a</sup> pH 9 GD	3	2.1300	
pH 8 GD	3	2.2667	2.2667
pH 7 GD	3		2.4300
pH 6 GD	3		2.6900
Sig.		.111	.065

### PEMBAHASAN

Isolasi yang dilakukan pada filtrat buah nanas oleh garam dapur dilakukan untuk mendapatkan ekstrak kasar bromelin yang merupakan enzim protease yang mengandung sulfhidril (-SH), yaitu glukoprotein yang mampu menghidrolisis protein menjadi senyawa asam amino yang lebih sederhana<sup>3,4</sup>.

Bromelin ini menghidrolisis ikatan peptida di tengah rantai peptida, sehingga di klasifikasikan sebagai endopeptidase. Selain itu bromelin aktif ini mengandung sistein dan histidin yang penting untuk aktivitas enzim. Enzim ini dengan demikian secara khusus memotong ikatan peptida dari gugus karbonil seperti yang ditemukan dalam arginin atau asam amino aromatik yaitu fenilalanin atau tirosin<sup>11</sup>.

Filtrat nanas yang diperoleh disimpan pada suhu 4 °C selama 3 jam sebelum ditambahkan garam dapur supaya lebih mudah membentuk endapan bromelin. Pembentukan enzim tersebut terjadi akibat pengikatan air bebas oleh garam dapur. Penelitian ini sejalan dengan penelitian isolasi bromelin dari kulit dan bonggol nanas dengan menggunakan garam ammonium sulfat yang merupakan garam yang sangat larut dalam air dan tidak bereaksi dengan enzim, sehingga memungkinkan garam ini digunakan untuk isolasi bromelin<sup>10</sup>.

Pada table 1. terlihat hasil isolasi bromelin oleh garam dapur 40% di dapatkan hasil rendemen tertinggi pada pH 9 sebesar 7,7768%. Dari hasil data di atas pH 9 menunjukkan nilai rendemen yang paling tinggi, hal ini karena konsentrasi 40% dari garam dapur merupakan konsentrasi yang

sudah mencapai titik jenuh dan pH 9 merupakan pH yang mendekati titik isoelektrik untuk bromelin yaitu pH 9,55<sup>13</sup>, sehingga didapatkan rendemen yang tertinggi karena bromelin mempunyai kelarutan terendah pada pH iso elektriknya, sehingga akan mudah membentuk endapan. Pengendapan terjadi karena kompetisi antara garam dan protein untuk mengikat air, dimana densitas garam lebih tinggi dibandingkan protein sehingga garam lebih kuat mengikat molekul air akibatnya menurunnya jumlah air yang terikat pada protein dan protein akan mengendap dari larutan<sup>18</sup>.

Pada table 2, hasil uji Anova Duncan untuk nilai rendemen bromelin menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada pH 6, pH 7 dengan pH 9 (p-value < 0.05) dan antara pH 6, pH 8 dan antara pH 8 dan pH 9 menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna (p-value > 0.05). pH 9 adalah pH yang mendekati pH iso elektrik di pH 9,55, sehingga rendemen nya paling tinggi dibandingkan pH 8, pH 7 dan pH 6, dan di dapatkan berat rendemen pH 9 > pH 8 > pH 7 > pH 6 yang berurutan turun berat rendemen nya sesuai turunnya pH yang menjauh dari pH titik isoelektrik,

Nilai aktivitas bromelin yang didapatkan dari hasil penelitian ini terlihat pada table 3. Nilai aktivitas optimal di dapatkan pada pH 7 dan pH 8 dengan nilai 7,67 U/mL. Hal ini terjadi karena adanya pengaruh konsentrasi ion H<sup>+</sup>, atau derajat keasaman dari pelarut yang mengelilingi protein enzim bromelin. Pada kondisi pH yang tepat, terjadi perubahan gugus ion pada sisi aktif enzim sehingga konformasi enzim lebih efektif dalam mengikat dan mengubah substrat menjadi produk. pH optimum merupakan pH saat gugus pemberi dan penerima proton (ion positif) yang berperan penting pada sisi katalitik enzim atau pada sisi pengikat substrat berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan, sehingga substrat lebih mudah berinteraksi dengan sisi katalitik enzim<sup>18</sup>. Adanya penurunan aktivitas

enzim pada pH 9 terjadi karena lingkungan di sekitar sisi aktif enzim mengalami kekurangan jumlah proton, sesuai<sup>8</sup>. Hasil penelitian Corzo, *et al.* (2012), bromelin mempunyai aktivitas optimum pada pH 7,7 dengan substrat kasein. Hasil penelitian Liliyany, *et al.* (2018) bromelin mempunyai nilai aktivitas optimum 7,19 U/mL dengan substrat kasein pada pH 7. Uji karakteristik dari enzim yang sama yaitu bromelin dengan memberikan hasil pH optimum yang hampir sama atau berbeda, hal ini bisa disebabkan oleh sampel yang berbeda.

Kadar protein bromelin yang terlihat pada table 4, mempunyai kadar protein optimum dari hasil penelitian ini pada pH 8 dengan kadar 3,3516 mg/mL. Pada penelitian ini, aktivitas enzim optimum berada pada pH 7-8, tapi kadar protein optimum berada pada pH 8, hal ini disebabkan karena pH 8 yang merupakan pH optimum dari aktivitas enzim, juga di pH 8 mempunyai sifat kelarutan proteinnya yang lebih kecil dibandingkan pH 7 karena lebih mendekati pH titik isoelektrik, sehingga protein lebih mudah mengendap, sehingga kadar proteinnya lebih tinggi dibandingkan pH 7 walaupun punya nilai aktivitas yang sama<sup>13</sup>.

Nilai aktivitas spesifik bromelin terlihat pada tabel 5, mempunyai nilai optimal pada pH 7 dengan nilai 2,69 U/mg. Penilaian aktivitas spesifik merupakan salah satu cara untuk menentukan kemurnian kandungan enzim dari hasil isolasi, dimana nilai aktivitas spesifik ini tergantung pada nilai aktivitas enzim dan kadar proteinnya. Dari hasil penelitian dengan di dapatkan nya data nilai optimum aktivitas spesifik bromelin pada pH 7, sesuai dengan nilai aktivitasnya optimum di pH 7 dan pH 8, tapi di pH 8 mempunyai kadar protein yang lebih tinggi sehingga nilai aktivitas spesifik nya di pH 8 lebih kecil. hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar bromelin yang di dapat dari hasil penelitian ini spesifik bromelin. sesuai

dengan hasil penelitian Martin, *et al.* (2014) dan Lilian *et al.* (2018), enzim bromelin mempunyai pH optimum pada pH 7.

Nilai aktivitas spesifik bromelin berdasarkan hasil statistik dengan uji Duncan, terlihat pada tabel 6. Nilai aktivitas spesifik pH 7 mempunyai perbedaan bermakna dengan pH 6, pH 8, dan pH 9 ( $p$ -value < 0.05), karena secara spesifik aktivitas bromelin optimum pada pH 7.

### KESIMPULAN

pH yang paling optimal untuk mengisolasi bromelin dari buah nenas dengan garam dapur 40% adalah pH 9 dengan berat rendemen optimum 7,7768%.

Aktivitas spesifik bromelin optimum pada pH 7 dengan nilai aktivitas spesifiknya 2,69 U/mg.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Direktur Poltekkes Kemenkes Bandung yang telah mengalokasikan dana penelitian untuk dosen dari DIPA Poltekkes Kemenkes Bandung.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Lehninger. 2017. Principles Of Biochemistry. 7<sup>th</sup> Ed. H. Freeman and Company New York.
2. Peter K. Robinson. 2015. Enzymes : principles and biotechnological applications. Essays Biochem : 59, p. 1-41. Portland Press Limited
3. Secor Jr, E. R., Carson VI, W. F., Cloutier, M. M., Guernsey, L. A., Schramm, C. M., WuC. A. & Thrall, R. S. 2005. Bromelain Exerts Anti-Inflammatory Effects in An Ovalbumininduced Murine Model of Allergic Airway Disease. *Cell Immunol.*, 237 (1): 68-75.
4. Chermahini, S.H. 2019. Bromelain as an anti-inflammatory and anti-cancer compound . *Int. J. Res. Pharm. Sci & Tech.*, 1(2), 53-57
5. Fileti, A.M.F; Fischer, G.A; Santana, J.C.C; Tambourgi, E.B.2009. Batch and Continuous Extraction of Bromelain Enzyme by Reversed Micelles. *Brazilian Archives of Biology and Technology*
6. Haynes, W.M. (ed.). 2016. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 97<sup>th</sup> Edition. CRC Press LLC, Boca Raton: FL, p. 4-7
7. Winarno, F.G., 2008. *Kimia Pangan dan Gizi*, Edisi terbaru. Jakarta. PT Gramedia Pustaka Utama
8. Kumaunang, Maureen, Vanda Kamu. 2011. Aktifitas Bromelin dari Ekstrak Kulit Nenas (*Ananas comosus*). FMIPA Universitas Samratulangi Manado. *Jurnal Ilmiah SAINS Vol. 11 No. 2, Hlm. 198-201.*
9. Masri, M. 2014. Variasi dan Pengukuran Aktivitas Bromelin dari Ekstrak Kasar Bonggol Nenas pada Variasi Suhu & pH. *Biogenesis Jurnal Ilmiah Biologi. Vol. 2 No. 2, hal 119-125.*
10. Dewi Nurhayati, Firman Solihat,M, Sundara Mulia, Y, Wibowo and Syamsuar. 2018. The Effect Amonium Sulphate Concentration on The Isolation Result of Bromelin Skin and Tubers of Fineapples. *International Journal of Current Research*
11. Gautam SS, Mishra S, Dash V, Amit K and Rath G. 2010. Cooperative Study or Extraction, Purification and Estimation of Bromelain from Stem and Fruit of Pineapple Plant. *Thai J. Pharm., Sci. Vol 1(1):2.*
12. Sebayang, F. 2006. Pengujian stabilitas enzim bromelain yang diisolasi dari bonggol nenas serta imobilisasi menggunakan kappa karagenan. *Jurnal Sains Kimia. 10:20- 26.*
13. Martins, B.C., Rescolino, R., Diego , Espindola,F., Zanchetta,B.,

- Tambourgi, B.E., and Silveira, E. 2014. Studies of stability and characterization this enzyme bromelain in pineapple (*Ananas comosus*). BMC Proceeding. 8 (Suppl 4): p.137
14. Liliany, D., Widyarman, A.S., Erfan, E., Sudiono, Y., and Djamil, M.S. 2018. Enzymatic Activity of Bromelain Isolated Pineapple (*Ananas comosus*) Hump and Its Antibacterial. Scientific Dental Journal.
  15. Said, I.M. 2012. Isolasi Bromelin dari Buah Nanas serta Pengaruhnya Terhadap Perubahan Struktur Jaringan Daging Sapi. AGRIPPLUS, Volume 22 Nomor : 01 Januari 2012, ISSN 0854-0128.
  16. Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry vol.72 : 248-254.
  17. Carlos A. Corzo, Krzysztof N. Waliszewski, Jorge Welti-Chanes. 2012. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. Food Chemistry: 133.p.631-635
  18. Nurhidayah, Masriany, Masri, M. 2013. Isolasi dan Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin dari Ekstrak Kasar Batang Nanas (*Ananas comosus*) Berdasarkan Variasi pH. Biogenesis. Vol 1, No.2. hal 116-122.